

АКТИВАЦИЯ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ БЕНЗИДИНА

Изучению метаболизма бензидина (4,4'-диаминобифенил, БД) как одного из канцерогенных ароматических аминов уделяется большое внимание [1, 2], при этом большая часть работ направлена на выяснение путей его активации, способности продуктов окисления взаимодействовать с ДНК и вызывать мутагенные эффекты. Вместе с тем для полного понимания механизмов повреждающего действия данного соединения на организм необходимо исследовать токсические эффекты влияния БД, которые могут быть вызваны как самим канцерогеном и продуктами его активации, так и «побочными» метаболитами, в частности активными формами кислорода: O_2^- , OH^- , H_2O_2 , возникающими при окислении ксенобиотиков монооксигеназной системой [3]. Одним из важнейших звеньев метаболизма, реагирующим на изменение концентрации кислородных радикалов, является перекисное окисление липидов (ПОЛ). В данной работе изучено состояние ПОЛ при воздействии БД. Предполагается, что гепатотоксическое действие канцерогена связано с инициацией ПОЛ и эффектированием его продуктами ряда жизненно важных процессов.

Материал и методика

Опыты проводили на беспородных белых крысах-самцах массой 150—200 г. БД вводили перорально в течение 4-х дней в 0,9 % NaCl, ежедневная доза препарата составляла 125 мг на кг массы животного. Содержание малонового диальдегида (МДА) определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) в динамике: на 5-е и 9-е сут после начала введения БД (в эти сроки происходят наибольшие изменения ферментов I и II фаз метаболизма ксенобиотиков) и в более поздние сроки на 15-е и 30-е сут [4]. Контролем служили крысы, получавшие 0,9 % NaCl в течение 4-х дней. Печень перфузировали охлажденной средой выделения (0,25М сахароза, 0,01М трис-HCl, pH 7,4) до исчезновения в перфузате гемоглобина, измельчали и гомогенизировали в той же среде в соотношении 2 : 8 (масса : объем). Выделение фракций митохондрий, цитозоля и микросом проводили стандартным методом дифференциального центрифугирования [5].

Активность супероксиддисмутазы (супероксид : супероксид-оксидоредуктаза, КФ 1.15.1.1, СОД) определяли методом Beyer W., Fridovich I. [6] и рассчитывали по формуле $A = T \% / (100 \% - T \%)$, где A — активность фермента (в усл. ед.), рассчитанная на мг белка, $T \%$ — процент торможения реакции восстановления нитросинего тетразолия в пробе (50 % ингибирование этой реакции соответствует 1 усл. ед. активности [7]). Для определения активности глутатионпероксидазы с перекисью водорода в качестве субстрата (глутатион восстановленный: перекись водорода — оксидоредуктаза, КФ 1.11.1.9, ГП) использовали метод Mill's в модификации Hafeman D. и соавт. [8], выражали в мкМолях GSH на мг белка. Концентрацию белка в цитозольной фракции определяли по методу Lowry O. и соавт. [9], в митохондриях и микросомах — методом Peterson G. [10]. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием t -критерия Стьюдента [11].

Результаты и их обсуждение

Результаты по содержанию ТБК-активных продуктов в субклеточных фракциях печени крыс при действии БД представлены на рис. 1 и 2. В микросомах на 5-е сут после начала введения БД (рис. 1) достоверных отличий количества МДА от контрольных значений нет, хотя тен-

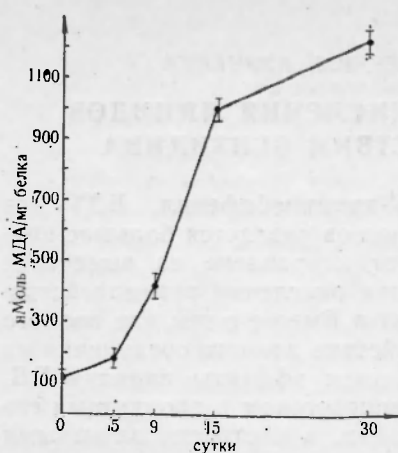


Рис. 1. Влияние бензидина на содержание малонового диальдегида в микросомах печени крыс:

здесь и на рис. 2: по оси абсцисс — время наблюдений, по оси ординат — количество малонового диальдегида (нМоль МДА на мг белка микросом). В каждой точке с обозначенным доверительным интервалом $n = 6$, $p < 0,001$

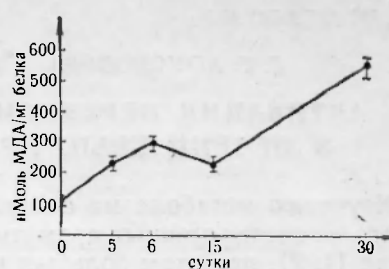


Рис. 2. Влияние бензидина на содержание малонового диальдегида в митохондриях печени крыс

денция к увеличению прослеживается. На 9-е и 15-е сутки наблюдается интенсивный рост содержания МДА, его количество по отношению к контролю увеличилось в 3,5 и 8,4 раза соответственно. Максимум содержания МДА, достигнутый на 15-е сут, сохраняется и на 30-е.

В митохондриях (рис. 2) достоверное увеличение количества МДА

наблюдается уже на 5-е сут после начала введения БД (202,5 %). На 9-е и 15-е сут интенсивность ПОЛ практически не изменяется, так как значения по содержанию ТБК-активных продуктов на 5-е, 9-е и 15-е сут достоверно не отличаются. Дальнейшее увеличение количества МДА в митохондриях печени наблюдается на 30-е сут и составляет 503,5 % по отношению к контролю.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что метаболизм БД в печени крыс сопровождается активацией ПОЛ. Однако в митохондриальной и микросомальной фракциях динамика этого процесса различна, интенсивность ПОЛ в микросомах большая по сравнению с митохондриями.

Механизм инициации ПОЛ в случае действия БД может быть понятен исходя из следующих представлений. Известно, что в печени активация ароматических аминов осуществляется двумя ферментными системами: ФАД-монооксигеназной системой и особенно цитохром Р-450 зависимыми оксидазами со смешанными функциями [12]. Показано также, что цитохром Р-450 и НАДФН-цитохром Р-450 редуктаза являются основными источниками образования активных форм кислорода в эндоплазматическом ретикулуме [13]. Поэтому стимуляция процессов микросомального окисления, имеющая место при интоксикации БД, приводит к увеличению генерации активированного кислорода. В митохондриях образование супероксидного анион-радикала и перекиси водорода связано с активностью НАДН-дегидрогеназы и убихинона [14]. Взаимодействие активных форм кислорода и мембранных липидов гепатоцитов с участием Fe^{2+} и Fe^{3+} ведет к инициации ПОЛ [15].

Протекание свободнорадикальных процессов в клетке регулирует антиоксидантная система, поэтому наблюдаемая нами значительная активация ПОЛ в микросомах и митохондриях в условиях действия БД может быть обусловлена не только возрастанием концентрации активных форм кислорода, но и снижением активности ферментов, определяющих антиоксидантный статус клетки. Было проведено исследование уровней активности ключевых антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы (таблица) на 5-е сут после начала введения БД, чтобы оценить состояние и резервные возможности антиоксидантной системы сразу после интоксикации. Установлено, что в митохондриальной фракции активности СОД и ГП при введении БД оста-

ются на уровне контроля. В цитозольной фракции активность СОД уменьшается в 2,4 раза, активность ГП достоверно от контрольных значений не отличается.

Исходя из полученных данных можно заключить, что в целом более интенсивный процесс ПОЛ в микросомах по сравнению с митохондриями обусловлен тем, что уже в ранние сроки после начала введения БД наблюдается падение активности цитозольной Cu , Zn -СОД, а следовательно, происходит снижение защитного действия антиоксидантной системы против кислородных радикалов, образующихся при метаболизме БД, в то время как митохондриальная Mn -СОД сохраняет свою активность.

Уменьшение удельной активности Cu , Zn -СОД при введении БД, возможно, является следствием окислительной инактивации фермента при взаимодействии с H_2O_2 [16], а также усиленной деградации СОД в результате предшествующей окислительной модификации. В пользу такого предположения свидетельствует тот факт, что Cu , Zn -СОД, инактивированная H_2O_2 , *in vitro* теряет стабильность и подвергается протеолизу в присутствии бесклеточных экстрактов эритроцитов [17]. Следует отметить, что возможны и иные причины уменьшения активности СОД при действии БД.

Таким образом, введение БД вызывает активацию ПОЛ в митохондриальной и микросомальной фракциях печени крыс. Этот процесс может быть обусловлен как снижением эффективности антиоксидантной защиты печени в результате уменьшения активности цитозольной Cu , Zn -СОД, так и увеличением стационарной концентрации радикалов кислорода, возникающих в процессе метаболической активации БД. Инициация ПОЛ, наряду с другими повреждающими гепатоциты эффектами, вызываемыми БД, обуславливает токсическое действие канцерогена.

Активность антиоксидантных ферментов в субклеточных фракциях печени крыс на 5-е сут после начала введения бензидина

Серия опыта		СОД, усл. ед. на мг белка	ГП, 10^{-6} М GSH/мин на мг белка
Цитозоль	Контроль	$1,24 \pm 0,22$	$14,44 \pm 0,87$
	БД	$0,52 \pm 0,19^{**}$	$17,38 \pm 4,86$
Митохондрии	Контроль	$0,31 \pm 0,02$	$30,52 \pm 1,62$
	БД	$0,32 \pm 0,02$	$24,11 \pm 4,08$

Примечания: ** — разница между контролем и опытом достоверна, $n=6$, $p \leq 0,01$.

Список литературы

1. Miller J. K., Miller E. C. // Environ. Health. Perspect. 1983. V. 49. P. 3.
2. Beland F. A., Kadlubar F. F. // Ibid. 1985. V. 62. P. 19.
3. Арчаков А. И., Карузина И. И. // Вестн. АМН СССР. 1988. № 1. С. 14.
4. Ohkawa H., Ohishi N., Yagy K. // Anal. Biochem. 1979. V. 95. P. 351.
5. Карузина И. И., Арчаков А. И. // Совр. методы в биохимии. М., 1977. С. 49.
6. Beyer W. F., Fridovich I. // Anal. Biochem. 1987. V. 161. P. 559.
7. Beachamp C., Fridovich I. // Ibid. 1971. V. 44. P. 276.
8. Hafeman D. G., Sunde R. A., Hoekstra W. G. // Journ. Nutr. 1974. V. 104. P. 580.
9. Lowry O. H., Roserbrough N. I., Farr A. L., Randall R. L. // Journ. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265.
10. Peterson G. L. // Meth. Enzymol. 1983. V. 91. Pt. 1. P. 95.
11. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. Мн., 1967. С. 5.
12. Ayrton A. D., McFarlane, Walker R. et al // Carcinogenesis. 1990. V. 11. № 5. P. 803.
13. Paine A. J. // Biochem. Pharmacol. 1978. V. 27. P. 1805.
14. Turrens J. F., Boveris A. // Biochem. Journ. 1980. V. 191. P. 421.
15. Lai C.-S., Piette L. H. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1977. V. 78. № 1. P. 51.
16. Di Guiseppi J., Fridovich I. // Arch. Biochem. and Biophys. 1980. V. 203. P. 145.
17. Salo D. C., Lin C. W., Pacifici R. E., Davies K. J. A. // Free Radic. Biol. and Med. 1986. V. 5. № 5/6. P. 335.